

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 198 42 164 A 1

51 Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/50

21 Aktenzeichen: 198 42 164.8
22 Anmeldetag: 15. 9. 1998
43 Offenlegungstag: 6. 4. 2000

DE 198 42 164 A 1

71 Anmelder:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE
74 Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

72 Erfinder:
Beier, Markus, 69120 Heidelberg, DE
56 Entgegenhaltungen:
Anal Biochem (1996), 243 (2), S. 218-227;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur Qualitätskontrolle beim Aufbau von Oligomerrastern

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man an bestimmte Rasterpositionen eine Phosphateinheit, die mit einer signalgebenden Reportergruppe verknüpft ist, ankondensiert, anhand des Signals der Reportergruppe den Grad der Oligomersynthese bestimmt und anschließend die Reportergruppe wieder اسپaltet.

DE 198 42 164 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Qualitätskontrolle beim Aufbau von Oligomerrastern.

Für diagnostische Screenings werden Mikrochips mit Oligomeren in Form von Rastern beschichtet (Oligomercchips/Biochips). Mit diesen kann dann eine Probe nach einem passenden, d. h. damit hybridisierenden, Molekül abgesucht werden. Solche Oligomerraster auf einem Chip können aus Nucleinsäureoligonukleotiden, wie DNA-, RNA- oder Nucleinsäurebiopolymeren oder analogen Verbindungen dazu bestehen, die auf einer festen Phase aufgebracht sind.

Die Fixierung der Oligomeren erfolgt nicht immer quantitativ, so daß nicht immer Chips mit dem gleichen Beschichtungsgrad erhalten werden. Nach dem Aufbau solcher Oligomerraster muß daher überprüft werden, ob die Synthese erfolgreich verlaufen ist, bzw. der Grad der erfolgreichen Synthese muß ermittelt werden. Bisher wurden hierzu mit einem permanenten (Fluoreszenz)label versehene Phosphateagenzien verwendet. Da diese Label nicht wieder abgespalten werden konnten, beeinträchtigen sie ggf. die anschließende Verwendung des Biochips.

Ein definierter Qualitätsassay für den Aufbau von Oligomerrastern auf einer Chipoberfläche, der keine störenden Nebeneffekte auslöst, ist daher bisher nicht bekannt. Auf dem noch in der Entwicklung begriffenen Gebiet der Biochip-Technologie ist jedoch eine Qualitätskontrolle unumgänglich, um eine reproduzierbare Herstellung gleicher Qualität zu gewährleisten.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern bereitzustellen. Das Verfahren soll universell einsetzbar sein und sich mit geringem Aufwand rasch durchführen lassen. Ferner soll durch die Qualitätskontrolle die anschließende Verwendung als Biochip nicht beeinträchtigt werden. Das Verfahren soll sich für alte Arten von Oligomerrastern eignen.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß eine Qualitätskontrolle ohne Beeinträchtigung der weiteren Verwendung des Chips durchgeführt werden kann, wenn an das sich auf dem Chip befindliche Oligomerraster eine Phosphateinheit ankondensiert wird, die reversibel mit einer signalgebenden Reportergruppe versehen ist. Durch Detektion des Signals der an die Oligomeren an den Rasterpositionen gebundenen Reportergruppe kann der Erfolg der Synthese kontrolliert werden, bzw. verschiedene Rasterpositionen können miteinander verglichen werden. Nach erfolgter Qualitätskontrolle wird die Reportergruppe wieder abgelöst.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man an Oligonukleotide an bestimmten Rasterpositionen (vorzugsweise an alle oder an eine vorher ausgewählte Anzahl) eine Phosphateinheit, die mit einer signalgebenden Reportergruppe verknüpft ist, ankondensiert, anhand des Signals der Reportergruppe den Grad der Oligomersynthese bestimmt und anschließend die Reportergruppe wieder abspaltet.

Durch Detektion der von den besetzten Rasterpositionen ausgehenden Signalen der Reportergruppe kann der Umfang des Syntheseerfolgs kontrolliert werden. Nach erfolgter Qualitätskontrolle kann die Reportergruppe wieder abgespalten werden und führt so bei den anschließenden Experimenten zu keinerlei störenden Effekten. Lediglich die Phosphatgruppe bleibt mit den Oligomeren verbunden. Sie stört jedoch die nachfolgende Verwendung, z. B. bei einer Hybridisierung, nicht, sondern erhöht vorteilhafterweise zudem

noch die Schmelztemperatur des an die feste Phase gebundenen Oligomers.

Erfindungsgemäß soll unter einer Phosphateinheit eine solche durch Methoden der Phosphoramidit-Chemie aufkondensierte Einheit verstanden werden. Desweiteren können die Phosphateinheiten auch durch bekannte Verfahren der Phosphormonoester-, Phosphordiester- oder H-Phosphonat-Chemie erzeugt werden.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Phosphoramidit als Basis der Phosphatgruppe beschrieben, was erfindungsgemäße bevorzugt ist. Dies ist jedoch nicht als Beschränkung auszulegen. Erfindungsgemäß wird die Phosphateinheit durch Reaktion des bereits an der festen Phase befindlichen Oligomers an dessen 5'- oder 3'-Ende mit dem Phosphoramidit nach Oxidation erzeugt. Hierbei wird das Phosphoramidit unter Zuhilfenahme eines aciden Katalysators (z. B. Tetrazol, Tetrazol-Derivate, Pyridinhydrochlorid) mit dem an der festen Phase befindlichen Oligomer-Strang umgesetzt. Nachfolgende Oxidation, z. B. mit Jod, tert-Butylhydroperoxid etc., ergibt eine stabile Phosphor(V)-Verbindung (= Phosphateinheit). Vorteilhaft erweist sich, daß man sich hierbei der üblichen Schritte der Synthese von Oligonukleotiden bedienen kann, die sich problemlos auf einem kommerziell erhältlichen DNA/RNA-Synthesizer automatisieren lassen. Hierbei sind keine Abänderungen der üblicherweise verwendeten Reagenzien oder Syntheseprotokolle nötig.

Die signalgebende Reportergruppe kann jedes beliebige signalgebende Molekül sein, das sich über einen entsprechenden Linker an ein Phosphoramidit ankoppeln läßt. Der Linker sorgt dafür, daß nach erfolgter Umsetzung des Phosphoramidits mit dem Oligomer auf der festen Phase und nach Detektion der Reportergruppe eine Abspaltung der Reportergruppe erfolgen kann. Bevorzugt ist ein Linkersystem vom Typ 2-(4-Aminophenylsulfonyl)ethyl-, wobei auch andere dem Fachmann bekannte Linker einsetzbar sind. Die Verwendung von 2-(4-Aminophenylsulfonyl)ethanol erlaubt durch Umsetzung der Aminofunktion mit signalgebenden Reportergruppen, die eine Sulfonyl- oder Carboxylgruppe tragen, den Zugang zu nahezu allen bekannten signalgebenden Reportergruppen. Signalgebende Reportergruppen können beliebige fluoreszierende, farbgebende, radioaktive, chemolumineszierende Verbindungen sein. Bevorzugt sind fluoreszierende Verbindungen, wie Dansylethanol, Fluorescein oder Pyren. Beispiele für weitere Reportergruppen sind für die Ankopplung an die Phosphatgruppe geeignet derivatisierte Derivate von Cy3, Cy5, Dabsylchlorid, TAMRA, Hexachlorofluorescein.

Das Verfahren kann auf beliebige Oligomerraster aus Oligonukleotiden/Nucleinsäurebiopolymeren angewendet werden, z. B. aus DNA, RNA und/oder Analogen davon. Unter Analogen sind beispielsweise Phosphorthioate, PNA, modifizierte DNA- oder RNA-Nucleinsäuren (z. B. 2'-O-Methyl...) oder auch andere Nucleinsäure-Typen mit verändertem "Backbone" oder Zucker (z. B. pRNA, homo-DNA, alpha-para-NA) oder deren Chimären zu verstehen. Desweiteren läßt sich das Reportergruppen-markierte Phosphoramidit auch mit dem N-terminalen Ende von Peptiden/Proteinen umsetzen und wie vorstehend beschrieben verwenden.

Die Qualitätskontrolle erfolgt beispielsweise bei einer fluoreszenten Reporter-Gruppe dadurch, daß der feste Träger, auf dem sich das markierte Oligomer-Raster befindet, mit einem für diesen Farbstoff geeigneten Lesegerät (z. B. Fluoreszenz-Mikroskop, Fluoreszenz-Scanner) ausgewertet wird. Hierbei wird vom Lesegerät für alle Oligomer-Positionen ein relativer Intensitätswert, der der relativen Menge an synthetisiertem Oligomer an dieser Stelle entspricht, ermittelt. Ein Vergleich der ermittelten relativen Intensitäten zu-

einander erlaubt einen quantitativen Vergleich der jeweiligen Belegung mit Oligomer an allen Stellen des Trägers bzw. gibt Auskunft über die Qualität des synthetisierten Oligomer-Rasters. Dieser Vergleich der relativen Intensitäten an den verschiedenen Positionen des Rasters erlaubt im Folgeschritt (Auswertung eines Hybridisierungs-Experiments des Oligomer-Chips mit Sonden) einen sicheren Vergleich der Intensitäten, die sich hierbei ergeben. Beispielsweise, wenn beim Qualitäts-Check für eine bestimmte Position nur eine geringe Oligomer-Konzentration relativ zu einer anderen gemessen wird, kann bei Verwendung dieses Chips in einem Hybridisierungsexperiment für diese Position erwartungsgemäß auch nur eine geringe Intensität relativ zu anderen ermittelt werden.

Nach erfolgter Qualitätskontrolle wird die Reportergruppe wieder abgespalten. Dies erfolgt bei Reportergruppen, die über ein Sulfonylethyl-ähnliches System an die Phosphor/Phosphatgruppen gebunden sind, durch Behandlung mit einer starken Base, z. B. DBU, Ammoniak, DBN, Diisopropylethylamin.

Das Verfahren läßt sich automatisieren und ist daher zum Massenscreening großer Chipchargen geeignet.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren erläutert, welche zeigen:

Fig. 1 Herstellung Phosphoramidit

Fig. 2 Kopplung des Phosphoramidits an das Oligomer

Fig. 3 Durchführung der Qualitätskontrolle

Fig. 4 Abspaltung der Reportergruppe

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Qualitätskontrolle an einem Oligomercip

a) Herstellung von (2-Cyanoethyl-2-dansylethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit

4,83 g 2-Dansylethanol (17,3 mmol) und 5,92 ml Diisopropylethylamin (34,6 mmol) werden in 30 ml wasserfreiem Dichlormethan aufgelöst und in einem Eisbad gekühlt. Dann werden langsam 4,5 g Chlor-(2-Cyanoethoxy)-diisopropylaminophosphan (19,0 mmol) zugesetzt. Das Eisbad wurde entfernt. Es wurde weitergerührt, bis die die DC eine vollständigen Umsetzung anzeigte. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung und Dichlormethan extrahiert, die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das so erhaltene Öl wurde mittels Flash-Chromatographie (50 g SiO₂; Toluol/Ethylacetat; 0–20% Ethylacetat) gereinigt. 5,7 g des Produkts wurden als fluoreszierendes Öl erhalten. Die Ausbeute betrug 69%. Das Reaktionsschema ist in Fig. 1 gezeigt.

b) Kopplung des (2-Cyanoethyl-2-dansylethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidits an das Oligomere

Die Ankopplung erfolgt automatisch mit Hilfe eines DNA-Synthesizers. Hierzu wird das fluoreszent-markierte Phosphoramidit analog eines "normalen" Nucleosidbausteins (-Phosphoramidits) in trockenem Acetonitril gelöst (0,5 molar) und auf die bereits bestehenden, an der festen Phase befindliche Oligomere aufkondensiert. Dies erfolgt unter Zuhilfenahme von Tetrazol. Üblicherweise erfolgt nach der Kondensation am DNA-Synthesizer ein sog. Capping-Schritt (z. B. Reagenz Essigsäureanhydrid mit Acylierungskatalysator N-Methylimidazol), um das unkontrollierte Weiter-Wachsen der Oligomerenkette zu verhindern; dieser Schritt ist hier nicht notwendig, stört aber auch nicht,

da mit dem fluoreszent-markierten Phosphoramidit ohnehin die Oligomerenkette das Ende des Wachstums erreicht hat. Wichtig ist der nachfolgende Oxidationsschritt, der die instabile Phosphor(III)- in eine stabile Phosphor(V)-Verbindung überführt. Hierzu wird eine Jod/Pyridin/THF/Wassermischung benutzt. Nun steht der so fluoreszenz-markierte DNA-Chip sofort zur qualitativen Überprüfung durch einen geeigneten Array-Reader zur Verfügung. Das Reaktionsschema ist in Fig. 2 gezeigt.

c) Durchführung der Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle erfolgt direkt im Anschluss an (b). Hierbei wird durch Bestrahlung des Chip mit der für den Farbstoff geeigneten Wellenlänge (Dansyl: 350 nm) die Fluoreszenz angeregt. Die Emission der Fluoreszenz (Dansyl: 510 nm) wird dann durch einen geeigneten Reader (Fluoreszenzmikroskop oder Fluoreszenzscanner) für jede Position des Chip ausgelesen und quantifiziert (typischerweise Graustufenwerte). Ist z. B. an einer bestimmten Rasterposition gar keine Fluoreszenz detektierbar, obwohl dort eine Oligomerensequenz aufgebaut sein sollte, so kann daraus gefolgert werden, daß an dieser Position die Synthese nicht erfolgreich war. Dieser Chip soll dann verworfen werden. Durch Vergleich der gemessenen Intensitäten kann auf die Menge der an dieser Position synthetisierten Oligomers geschlossen werden. Dies kann dann bei der Verwendung des Oligomer-Chips in Hybridisierungsexperimenten berücksichtigt werden. So kann dann für jeden einzelnen Chip ein Qualitätsprofil durch die relativen Fluoreszenzintensitäten aller Rasterpositionen (z. B. im Sinne einer Excel-Tabelle) erstellt werden. Dies hilft dem Anwender entsprechend bei der Auswertung seiner Hybridisierungsexperimente. Das Reaktionsschema ist in Fig. 3 gezeigt.

d) Abspaltung der Dansylverbindung

Nach erfolgtem Qualitäts-Check kann die Dansylverbindung durch Behandlung mit einer starken Base, z. B. DBU oder DBN wieder abstrahiert werden. Dies wird zweckmässig durch Schwenken des Oligomer-Chip in der Base erreicht. Im Falle des oben angeführten Dansylfarbstoffes und unter Verwendung von 1 M DBU in Acetonitril ist das bereits spätestens nach 1–2 min erreicht. Gleichzeitig mit der Abspaltung des Dansylrestes erfolgt simultan die Abspaltung der β -Cyanoethyl-Phosphatschutzgruppe. Die Reste (Styrol-Derivate) des Dansyl- und der Cyanoethyl-Gruppen verbleiben in der basischen Lösung und können einfach gewegewaschen werden. Der DNA-Chip steht nach der Abspaltung und nach Waschen sofort für die angestrebte Verwendung (z. B. Hybridisierungsexperimente) zur Verfügung. Die am Oligomer verbleibende Phosphat-Gruppierung erhöht zudem vorteilhafterweise die Temperatur, bei der die Hybridisierungsexperimente erfolgen können. Das Reaktionsschema ist in Fig. 4 gezeigt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern, **dadurch gekennzeichnet**, daß man an bestimmten Rasterpositionen gebundenen Oligonukleotiden eine Phosphateinheit, die mit einer signalgebenden Reportergruppe verknüpft ist, ankondensiert, anhand des Signals der Reportergruppe den Grad der Oligomersynthese bestimmt und anschließend die Reportergruppe wieder abspaltet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide aus DNA und/oder RNA

bestehen.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reportergruppe eine fluoreszierende, farbgebende, radioaktive, oder chemolumineszierende Gruppe ist. 5

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Abspaltung der Reportergruppe unter basischen Bedingungen erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle der Verwendung einer fluoreszierenden Gruppe das Signal der Reportergruppe mittels Fluoreszenz-Mikroskop oder Fluoreszenz-Scanner bestimmt wird. 10

6. Abspaltbare Markierung zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einer Phosphateinheit und einer signalgebenden Reportergruppe besteht. 15

7. Markierung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die signalgebende Reportergruppe eine fluoreszierende Gruppe ist. 20

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

60

65

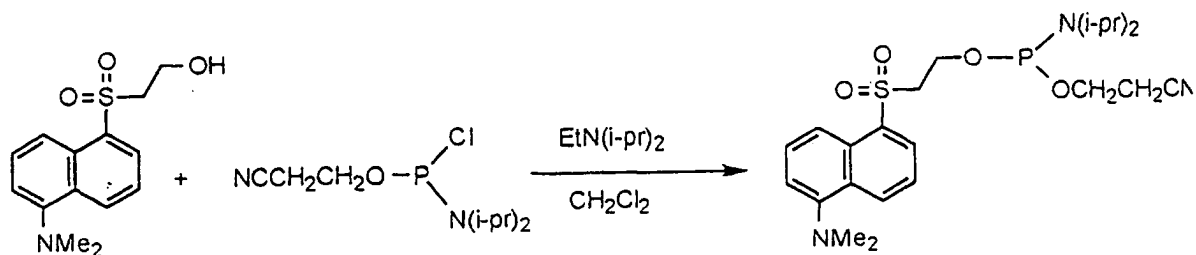


Fig. 1

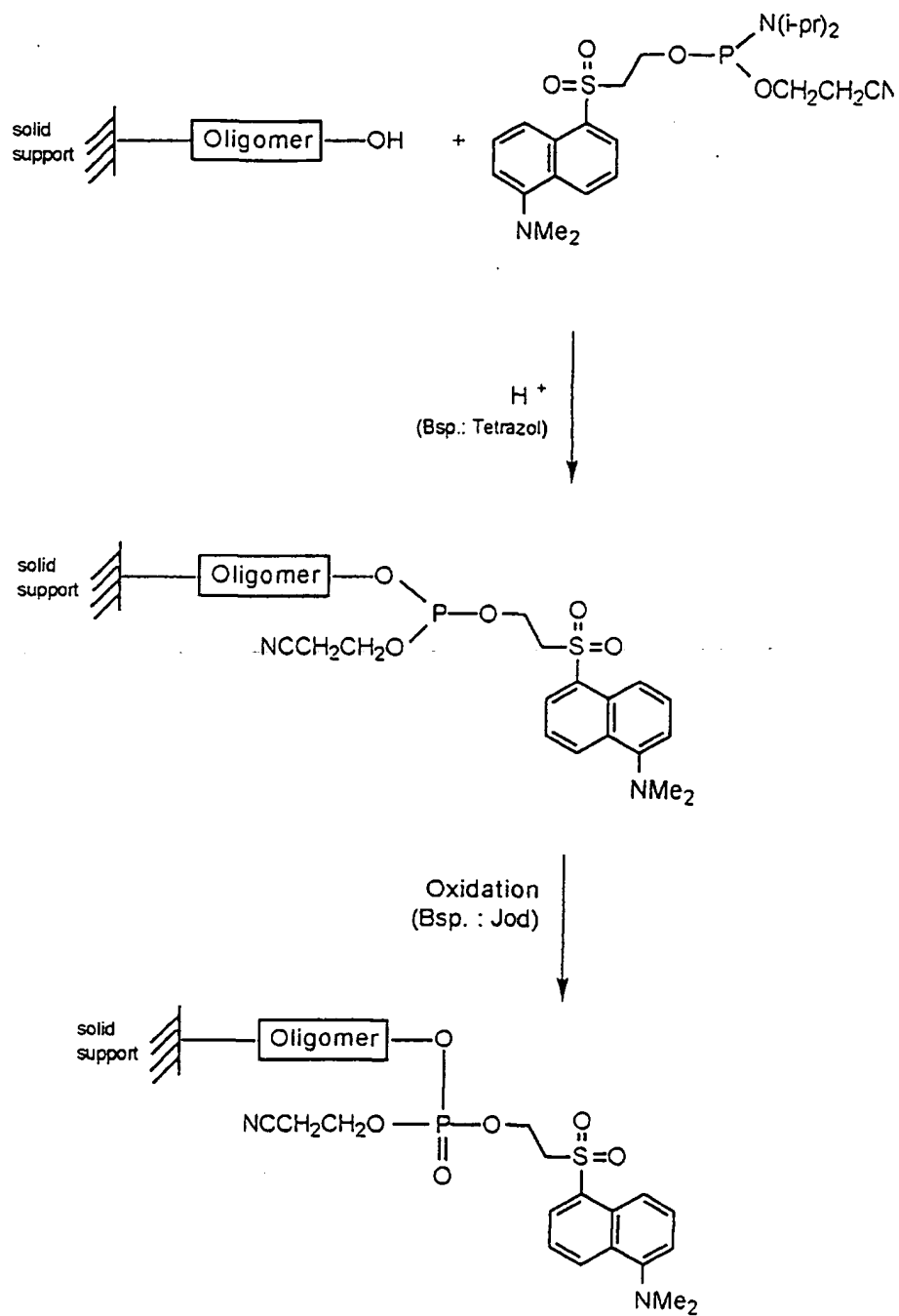


Fig. 2

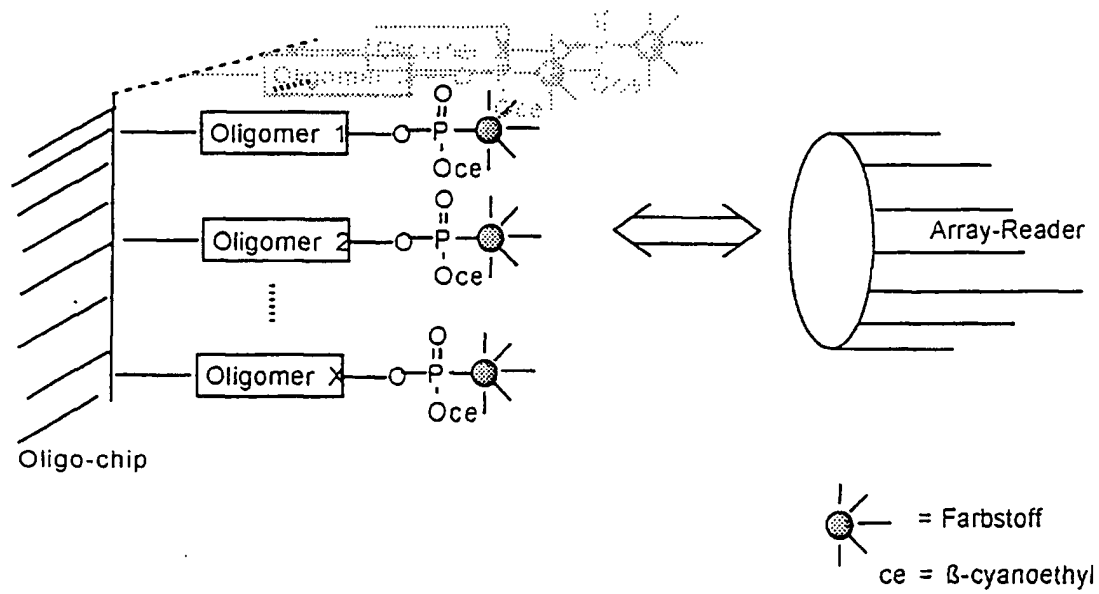


Fig. 3

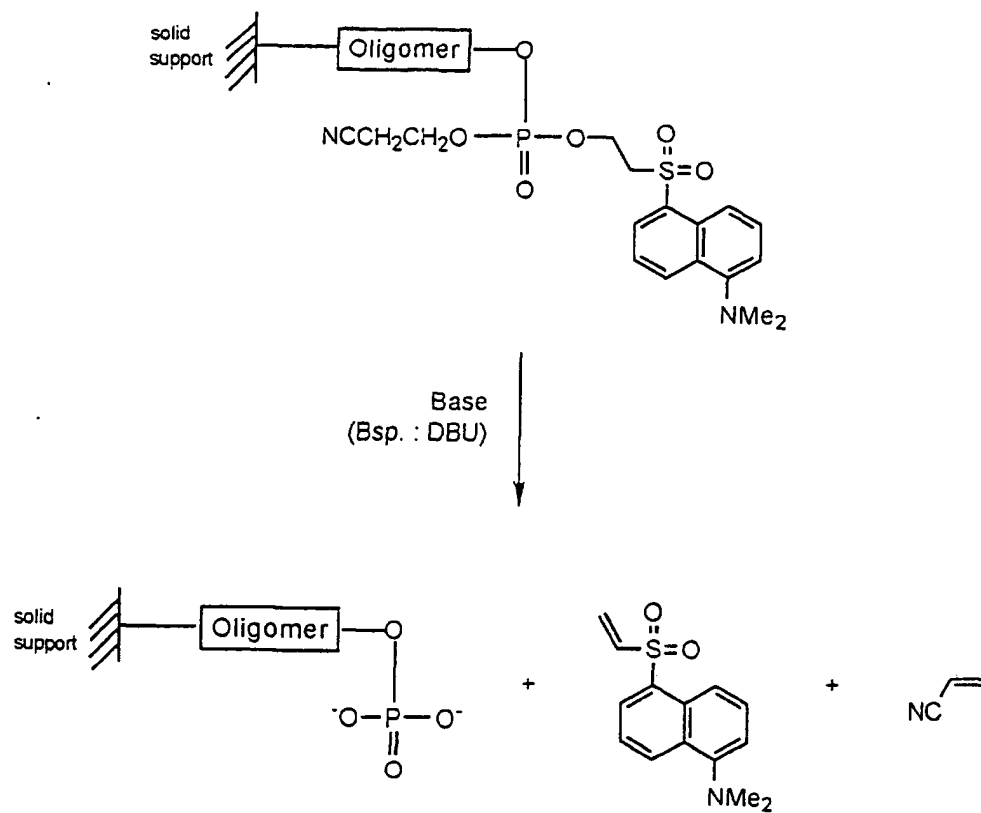


Fig. 4